



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Ocena pracy doktorskiej Pani mgr farm. Anny Diany Michalskiej
Tytuł pracy: „Molekularne podstawy lekooporności szczepów klinicznych
***Proteus mirabilis* na antybiotyki beta-laktamowe, aminoglikozydy oraz**
fluorochinolony”

Temat pracy doktorskiej Pani mgr Anny Diany Michalskiej dotyczy jednego z najistotniejszych obecnie problemów mikrobiologii klinicznej, a mianowicie problemu oporności bakterii na antybiotyki. Mimo iż od lat, zwłaszcza w krajach rozwiniętych, wprowadzane są nowe programy, regulacje prawne i ograniczenia nadmiernego stosowania antybiotyków, tempo narastania oporności wśród praktycznie wszystkich gatunków bakterii nie słabnie i znacznie wyprzedza możliwości opracowania nowych terapii. Zjawisko to jest istotne w przypadku bakterii chorobotwórczych, a także może nawet w większym stopniu w przypadku bakterii względnie chorobotwórczych, które wchodzą w skład normalnej flory ludzi i zwierząt.

Doktorantka w swojej pracy zajęła się bakteriami z gatunku *Proteus mirabilis*. *P. mirabilis* jest pałeczką jelitową, która bytuje w przewodzie pokarmowym ponad 50% ludzi, jako element normalnej mikroflory. Jest to typowy patogen oportunistyczny, który u osób z grup ryzyka może powodować różnorodne infekcje. Najczęściej są to zakażenia układu moczowego, zwłaszcza u chorych cewnikowanych, gdzie ten drobnoustrój zajmuje wysoką pozycję po zakażeniach *Escherichia coli*. Poza układem moczowym, *P. mirabilis*, podobnie jak inne pałeczki jelitowe, może być przyczyną niekiedy innych zakażeń, o bardzo różnej lokalizacji. Na ogół *P. mirabilis* był uznawany za drobnoustrój stosunkowo wrażliwy na antybiotyki, a więc dość łatwy do eliminacji. Praca doktorska mgr Diany Michalskiej pokazuje go jednak w nowym świetle. Okazuje się, że większość badanych przez nią szczepów zdołała już nabyć oporność na antybiotyki najczęściej stosowane w leczeniu zakażeń układu moczowego, który był najczęstszym źródłem badanych izolatów.

Praca doktorska mgr Anny Michalskiej jako całość liczy 195 stron, na początku umieszczony jest w spis treści, następnie począwszy od strony 8 do 18 znajduje się wykaz nazw i skrótów stosowanych w pracy. Sama praca ma układ typowy i w jej skład wchodzi następujące rozdziały: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja i wnioski. Na końcu umieszczono: streszczenie w języku polskim i angielskim, rozdział zatytułowany literatura (lepiej brzmiałby tytuł „piśmiennictwo”) oraz informacja na temat finansowania badań.

Ostatnia informacja jest szczególnie istotna, jako że badania prowadzone przez doktorantkę były dość kosztowne. Bardzo pozytywnie należy ocenić fakt, że doktorantka potrafiła zadbać o ich finansowanie i udało jej się samodzielnie kierować dwoma projektami badawczymi skierowanymi do młodych naukowców.

Pierwsza część pracy, Wstęp, obejmuje 47 stron, na których doktorantka dość szczegółowo charakteryzuje gatunek *P. mirabilis*, może nawet nieco zbyt szczegółowo opisuje metody diagnostyczne. Natomiast szczegółowy opis czynników wirulencji i ich udział w procesie chorobowym uważam za w pełni uzasadniony. Nie nazwałabym jednak rzęsek „wypustkami cytoplazmatycznymi”, jako, że są to przecież organelle o określonej strukturze.

Druga część wstępu obejmuje analizę gatunkowej i nabytej oporności *P. mirabilis* na antybiotyki. Szczególnie dużo miejsca autorka poświęca beta-laktamazom o rozszerzonym spektrum aktywności. Omawia również nabyte beta-laktamazy AmpC. Z innych oporności doktorantka charakteryzuje nabyte mechanizmy oporności na fluorochinolony oraz aminoglikozydy. Lektura tych rozdziałów pozwala stwierdzić rzetelną wiedzę i odczytanie autorki na interesujący ją temat.

Cel pracy jest w zasadzie zrozumiały, ale w punkcie pierwszym warto byłoby dodać, że chodzi autorce o metodę fenotypową. Ponadto, w tym samym punkcie doktorantka może nie tyle ma na celu „wykrycie”, co potwierdzenie testów wcześniej wykonanych w pracowni diagnostycznej, a więc potwierdzenie p-rzynależności szczepów do właściwej grupy. Dane mówiące, że ESBL⁺ szczepy *P. mirabilis* stanowiły 15,6% wszystkich izolatów *P. mirabilis* w określonym czasie, pochodziły jak pisze sama autorka z systemu MikroBIONET w pracowni diagnostycznej. Natomiast istotnym celem pracy było porównanie 75 izolatów *P. mirabilis* ESBL⁺ z taką samą liczbą izolatów ESBL⁻, zarówno pod kątem oporności na inne antybiotyki, jak pod kątem materiałów z jakich pochodziły, płci i wieku chorych od których pobrano materiały oraz oddziałów, z których ci chorzy byli hospitalizowani, a ten cel nie został wyraźnie przedstawiony. Ponadto, kolejność przedstawionych celów powinna odpowiadać kolejności wyników omawianych w rozdziale „Wyniki”.

Rozdział „Materiał i metody” został przygotowany bardzo starannie. Autorka przedstawia w tabeli wszystkie stosowane startery oraz warunki reakcji PCR. Ponadto omówiła metody identyfikacji bakterii, określania wartości MIC, izolacji plazmidów, elektroforezy oraz zastosowane metody statystyczne.

W rozdziale „Wyniki”, doktorantka na początku przeprowadza analizę porównawczą szczepów ESBL⁺ i ESBL⁻. Stosuje w tym celu z powodzeniem analizę statystyczną.

Wykazuje, że szczepy ESBL⁺ posiadają znamienne statystycznie więcej determinant oporności niż szczepy ESBL⁻, również na antybiotyki nie należące do beta-laktamów, takie jak aminoglikozydy i fluorochinolony. Autorka stara się także zsynchronizować wrażliwość badanych szczepów na antybiotyki beta-laktamowe z obecnością poszczególnych beta-laktamaz. Analizuje wartości MIC poszczególnych antybiotyków beta-laktamowych w odniesieniu do obecności konkretnych typów ESBL oraz AmpC. Daje się zauważyć, że większa liczba wytwarzanych beta-laktamaz może korelować z wyższą opornością na penicyliny, zwłaszcza obecność enzymów klasy C tłumaczy oporność na penicyliny z inhibitorem. Jednak wyniki nie są jednoznaczne, jako że podobne wartości MIC zaobserwowano również w przypadku szczepów, u których wykryto tylko jeden rodzaj ESBL. Brak jednoznacznych korelacji w tym przypadku jest zrozumiały, jako że interpretacja tego typu wyników jest bardzo trudna, zwłaszcza dla antybiotyków beta-laktamowych, gdzie zidentyfikowanie wszystkich możliwych czynników, które mogłyby wpływać na wartość MIC danego antybiotyku, przy obecnych możliwościach badawczych, zdecydowanie przekracza możliwości pracy doktorskiej. Znacznie łatwiej było odnieść wyniki badania MIC aminoglikozydów do obecności genów kodujących enzymy modyfikujące te antybiotyki oraz genów metylotransferaz 16S rRNA. W tym przypadku korelacja była bardzo duża. Autorka z kolei nie zaobserwowała istotnego wpływu obecności plazmidowych genów kodujących białka Qnr na poziom wrażliwości badanych izolatów na fluorochinolony, jako że wszystkie badane szczepy ESBL⁺ wykazywały wysoką oporność na ciprofloksacynę, niezależnie od obecności genów *qnr*. Sugerowałabym, żeby przed publikacją autorka zbadała wrażliwość tych szczepów również na lewofloksacynę i wówczas może wystąpią jakieś różnice wrażliwości.

Dyskusja liczy 27 stron i jest dość obszerna. Właściwie rozdział ten powinien być zatytułowany „Omówienie wyników i dyskusja”, ponieważ dopiero w tym rozdziale znajdujemy omówienie wyników zamieszczonych w tabelach w rozdziale „Wyniki”. W rozdziale „Dyskusja” oprócz omówienia korelacji między wartościami MIC, a obecnością genów oporności, autorka omawia wyniki, które uzyskała poprzez sekwencjonowanie genów beta-laktamaz. W końcowej części, na podstawie badań własnych oraz literatury, analizuje możliwość wspólnego występowania różnych determinant oporności na jednym plazmidzie lub transpozonie. Taka ewentualność znacznie zwiększa możliwość jednoczesnego rozprzestrzeniania się tych determinant, zarówno w obrębie gatunku, jak i międzygatunkowo. Ma to ogromne znaczenie epidemiologiczne. Doktorantka porównuje wyniki własne z uzyskanymi przez innych autorów w piśmiennictwie światowym. Dyskusja jest zdecydowanie dobrze napisanym rozdziałem, na podstawie którego można zorientować się, co nowego wniosły badania mgr Anny Michalskiej do aktualnego stanu wiedzy na temat determinant oporności dominujących u szpitalnych szczepów *P. mirabilis*.

Pracę kończą 4 wnioski, z których dwa (wniosek 1 i 3) są bardzo rozbudowane, i być może należałoby je podzielić. We wniosku nr 2, autorka z rozpędu pisze o działaniu drobnoustrojobójczym, zamiast drobnoustrojostatycznym. Antybiotyki beta-laktamowe, jak również aminoglikozydy są co prawda zaliczane do antybiotyków bakteriobójczych, ale czy i w jakim stężeniu działały bójczo na badane szczepy, tego nie wiemy. Testy MIC, jak sama nazwa wskazuje badają jedynie stężenie bakteriostatyczne.

Po wnioskach, autorka zamieszcza krótkie streszczenie, które w sposób zwięzły przedstawia zasadnicze elementy pracy. W streszczeniu już nie powtarza wniosków, co wydaje się słuszne.

Piśmiennictwo obejmuje imponującą liczbę 390 pozycji, z czego większość to prace aktualne, wydane w 2013 i 2014 roku. W piśmiennictwie nie wiem, jakim algorytmem posługiwała się doktorantka, wymieniając w niektórych przypadkach wszystkie nazwiska autorów (nawet 6 autorów), a w innych podając tylko trzy nazwiska i współpracownicy.

Reasumując, przedstawioną przez mgr Annę Michalską pracę oceniam wysoko. Praca wnosi istotny wkład do puli wiedzy na temat mechanizmów powstawania i rozprzestrzeniania się oporności wśród pałeczek *Enterobacteriaceae*, a zwłaszcza szczepów *P. mirabilis*. Autorka przedstawiła zamierzone cele badawcze i w dalszej części pracy je zrealizowała. Uzyskane przez nią wyniki mają wysoka wartość merytoryczną, a sposób przedstawienia pracy świadczy o dojrzałości naukowej doktorantki. Uwagi recenzenta, mają charakter raczej redakcyjny i nie umniejszają wartości pracy.

Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, o przyjęcie pracy pt. „Molekularne podstawy lekooporności szczepów klinicznych *Proteus mirabilis* na antybiotyki beta-laktamowe, aminoglikozydy oraz fluorochinolony” oraz o dopuszczenie mgr Anny Diany Michalskiej, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Prof. dr hab. med. Grażyna Myśliwiec

Warszawa, 05.05.2015